

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年5月6日 (06.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/037288 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 45/00, 38/17, A61P 35/00, 37/04INSTITUTE) [JP/JP]; 〒153-0041 東京都目黒区駒場  
一丁目3番8号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013416

(71) 出願人 および

(22) 国際出願日: 2003年10月21日 (21.10.2003)

(72) 発明者: 松島 綱治 (MATSUSHIMA, Kouji) [JP/JP];  
〒271-0092 千葉県松戸市松戸159-1 第3住宅  
2-905 Chiba (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(72) 発明者; および

(26) 国際公開の言語: 日本語

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 米山 博之  
(YONEYAMA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒112-0002 東京都  
文京区小石川2-9-1 2-201 Tokyo (JP). 張 雁云  
(ZHANG, Yuang) [JP/JP]; 〒112-0004 東京都文京区  
後楽1-5-3 後楽寮209号室 Tokyo (JP). 金ヶ崎  
士朗 (KANEGASAKI, Shiro) [JP/JP]; 〒153-0041 東京  
都目黒区駒場4-2-3-2 11 Tokyo (JP). 芥 照夫  
(AKUTA, Teruo) [JP/JP]; 〒862-0901 熊本県熊本市東  
町4-8-10 国家公務員南住宅104号 Kumamoto  
(JP).(30) 優先権データ:  
特願2002-310090

2002年10月24日 (24.10.2002) JP

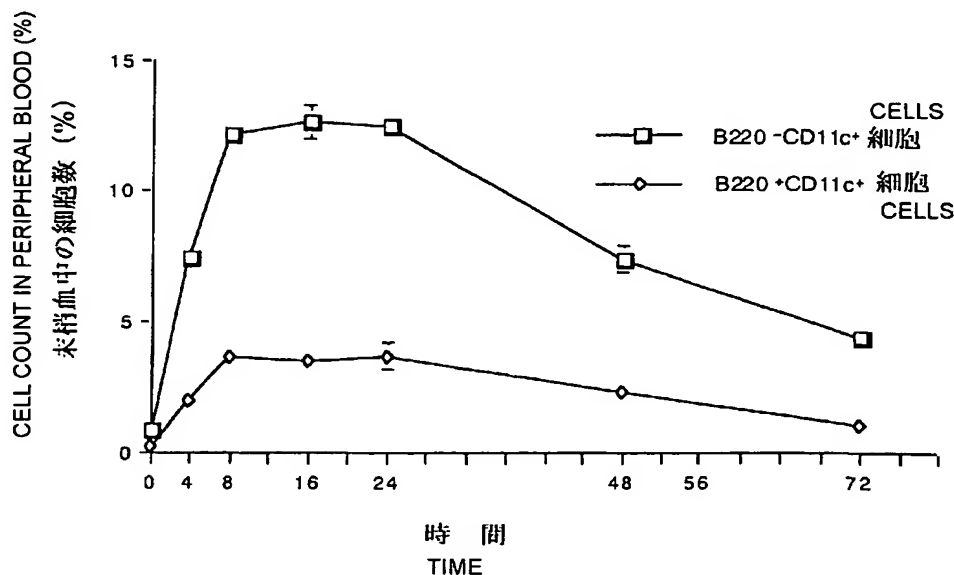
特願2003-170091 2003年6月13日 (13.06.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式  
会社エフェクター細胞研究所 (EFFECTOR CELL

[続葉有]

(54) Title: AGENT ELEVATING DENDRITIC CELL PRECURSOR LEVEL IN BLOOD

(54) 発明の名称: 樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤



(57) Abstract: Although the therapeutic application range of dendritic cells has been more and more enlarged, dendritic cell precursors occur only in a small amount in peripheral blood. Therefore, it is still difficult to obtain dendritic cell precursors in a therapeutically available amount even though these precursors are grown *in vitro*. To effect a therapy with the use of dendritic cells in practice, accordingly, it is a key factor to elevate the dendritic cell precursor level in the peripheral blood of a patient. An agent elevating the dendritic cell precursor level in blood which comprises, as the active ingredient, an agonist to a receptor expressed in immature dendritic cells or its functional derivative.

[続葉有]

WO 2004/037288 A1



(74) 代理人: 成瀬 勝夫, 外(NARUSE, Katsuo et al.); 〒105-0003 東京都港区西新橋2丁目11番5号 セントラル新橋ビル5階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 樹状細胞の治療への応用領域が拡大されつつあるが、樹状細胞前駆体は末梢血中に僅かしか存在しないために、治療に役立つだけの量を入手することは、invitroでの増殖を行ってもなお困難である。従って、患者の末梢血における樹状細胞前駆体のレベルの上昇を図ることは、樹状細胞による治療を実用化させる上で重要な鍵を握っている。本発明は、未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニスト又はその機能的誘導体を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤である。

## 明細書

### 樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

#### 技術分野

本発明は、樹状細胞の血中レベル上昇剤及び該作用を有する両親媒性高分子で化学修飾された新規なアゴニスト誘導体に関する。

#### 背景技術

樹状細胞(dendritic cells; DC と略記する場合がある)は、幹細胞である  $CD34^{+}$  細胞から分化し、樹枝状の突起を持つという形態的特徴を有し、生体内において広く分布しており、生体内 trafficking 能力(移動能力)により、抗原の摂取とT細胞への抗原提示を効率よく行う細胞であることが知られている。即ち、樹状細胞は、他の免疫担当細胞と同様に骨髓幹細胞に由来し、増殖分化・成熟の過程で分布する組織や器官を変えつつ、免疫監視細胞としての役割を果たしている細胞である。

樹状細胞の増殖分化・成熟の過程は次の5段階に分けることができる。即ち、(1) 祖細胞期(DC progenitor)：主に骨髓に存在し、自己複製しながら前駆細胞を産生する。(2) 前駆細胞期(DC precursor)：定常状態で骨髓から血行性に生体の臓器にコンスタントに供給され、各臓器の血管壁を越えて組織内に入り上皮内や間質に分布する。(3) 見張り番期(sentinel DC)：樹状細胞はこのステージでは貪食能を持ち、分布した各臓器内に侵入してくる抗原を摂取する。表皮の Langerhans 細胞、気道上皮の樹状細胞、心・肝など実質臓器の interstitial DC などがこの代表である。(4) 抗原輸送期(antigen-transporting DC)：樹状細胞は抗原情報を取り込むことにより一段階成熟して遊走能を獲得す

る。ヒト扁桃の場合は樹状細胞は陰窩上皮からT細胞領域(濾胞間域)まで扁桃組織内を遊走し、そこで免疫応答を起こす。他の臓器では、樹状細胞の多くは輸入リンパ管に入り、リンパ行性に所属リンパ節へ遊走し、T細胞領域(傍皮質)へ集積する。(5) 抗原提示期(mature DC): リンパ臓器に入った樹状細胞は最終段階にまで成熟する。そして、T細胞と細胞集塊(クラスター)を形成して抗原特異的T細胞を選び出し、抗原提示を行う。その後、樹状細胞はT細胞領域でアポトーシスにより一生を終えるといわれる(医学の歩み Vol. 200, No.6, 472-476 (2002)参照)。

末梢血から採取した樹状細胞(前駆体)を、*in vitro* で、例えばGM-CSF及びTNF $\alpha$ の存在下に増殖させた後、疾患抗原、例えば腫瘍細胞等の疾患抗原で刺激し、これを生体内に戻すことにより、疾患に対する免疫療法が増強されることが知られている。これは、樹状細胞による免疫療法、或いはワクチン療法と云われ、対象疾患としては、メラノーマ、腎ガン、前立腺ガン、白血病、転移性悪性腫瘍等多岐にわたり試みられている。この様に樹状細胞の治療への応用は広く注目されており、樹状細胞を使った免疫療法は腫瘍のみならず、感染、移植や自己免疫の領域にも広がろうとしている(例えば、稲葉カヨ、細胞工学 Vol.19, No.9, 1282-1286(2000), 河本 宏他、細胞工学 Vol.19, No.9, 1289-1293(2000), 伊豫田智典他、細胞工学 Vol.19, No.9, 1311-1317(2000), 高山卓也他、分子細胞治療 Vol.2, No.6, 53-56(2001)参照)。

未熟樹状細胞において発現しているレセプターとして、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CCR11及びCXCR4が知られている。これ等のレセプターに対するリガンドとして、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、TARC、MDC、MIP-3 $\alpha$ 、MIP-3 $\beta$ 、LARC、TECK、BLC、

SDF-1、Exodus-1、Exodus-2 その他が知られている。中でも、CCR-1 及び CCR-5 に共通するリガンドとして MIP-1 $\alpha$ 、RANTES、MARC 及び LCC-1(ref)が知られている(例えば、中野英樹、細胞工学 Vol. 19, No.9, 1304-1310(2000)参照)。

リガンド(アゴニスト)と同様の生物活性を有するリガンドの機能的誘導体も知られており、例えば、MIP-1 $\alpha$ については、MIP-1 $\alpha$ の 26 番目の Asp を Ala に置換し、アミノ末端が Ser より始まる 69 アミノ酸よりなる MIP-1 $\alpha$ 変異体 (BB10010) が知られている。この MIP-1 $\alpha$ 変異体は著しく改善された抗凝集能を有すると共に野生型と同等の活性を有することが見出され、癌化学療法副作用である血中の顆粒球減少症の改善について検討されている (E. Marshall et al., European Journal of Cancer, Vol. 34, No. 7, pp. 1023-1029(1998))。

両親媒性高分子の一種である部分ブチルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体で化学的に修飾されたネオカルチノスタチンが制癌剤 (一般名称: ジノスタチンスチマラマー) として既に知られている (特公平 1-33119 号)。これは、血中に投与されたとき、固形腫瘍にほぼ選択的に集積し、長時間にわたり腫瘍内に維持されるという、所謂、EPR 効果を示すことが知られており、ガン特異的ターゲティング型の制癌剤として使用されている。また、両親媒性高分子で化学修飾されたペプチド性アゴニスト又はその機能的誘導体も知られている (WO 01/83548)。更に、ポリエチレングリコールで修飾されたキサンチンオキシダーゼも腫瘍細胞に対して EPR 効果を示すことが知られている。

(特開平 11-060499 号)。これらは、何れも、腫瘍細胞に対して直接的な攻撃性を有する物質を用いて抗腫瘍効果を達成するものであり、攻撃性物質を標的患部に選択的に集積させることにより、正常な細胞や組織への影響を少なくすることを目的としている。

また、両親媒性高分子の一種であるポリエチレングリコール誘導体でタンパク質を修飾することにより、生体内クリアランスを遅延させ、或いは抗原性を低下させることは知られている(Yoshimoto et al., Jpn. J. Cancer Res., 77, 1264(1986)、Abuchowski et al., Cancer Biochem. Biophys., 7, 175(1984)、特開昭 61-178926 号公報、特開昭 62-115280 号公報、特再表 WO96/28475 号公報、特表平 10-513187 号公報、特開平 11-310600 号公報、特表 2000-517304 号公報、)。更に、ポリエチレングリコールで修飾されたインターロイキン-1、インターロイキン-6、インターフェロン等が知られている(特開平 5-117300 号公報、特開平 6-256394 号公報、特開平 9-25298 号公報)。

#### 発明の開示

上述の様に樹状細胞の治療への応用領域が拡大されつつあるが、樹状細胞前駆体は末梢血中に僅かしか存在しないために、治療に役立つだけの量を手に入れることは、in vitro での増殖を行ってもなお困難である。従って、患者の末梢血における樹状細胞前駆体のレベルの上昇を図ることは、樹状細胞による治療を実用化させる上で重要な鍵を握っている。本発明はそのための技術的手段を提供することを目的とする。

先に、本発明者は、下記参考例 1 に示すように、マウスに *Propionibacterium acnes* (以下 P.acnes と云う) の死菌を投与することにより、樹状細胞前駆体 (F4/80 抗原陰性、B220 抗原陰性、CD11c 抗原陽性細胞) が血液中に誘導されることを見出した。その後の研究により、この樹状細胞前駆体誘導作用は抗 Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) 抗体により抑制されることを見出し、樹状細胞前駆体の誘導メカニズムに MIP-1 $\alpha$  延いては未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニストが関与しているとの推定をするに至り、

更に研究を進め、生体外から上記アゴニスト、例えば MIP-1 $\alpha$  を投与することにより血中に存在する樹状細胞前駆体の濃度レベルが少なくとも数十倍のオーダーで上昇するという予想外の現象を発見し、本発明をなすに至った。なお、本件明細書の記述において、特段の断りがない限り、「樹状細胞」なる用語は、その様々な成熟段階にあるものの総称として用いられる。

しかし、天然型の MIP-1 $\alpha$  の如きリガンドの多くは生理的条件下で凝集体を形成し沈殿し、活性の消失を生ずることがしばしば問題になっていた。この問題を解決するために、これ等リガンドの樹状細胞前駆体の血中濃度レベル上昇作用を更に向上させると共に血中安定性の改善することを目的として更に研究を行った。

即ち、本発明者等は、未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニストの代表例としての MIP-1 $\alpha$  及びその機能的誘導体の一例である BB10010 に着目し、これ等リガンドの両親媒性高分子による化学修飾を試み、化学修飾したリガンドがその活性を阻害されることなく、寧ろ活性が向上することを見出し、新規なアゴニスト誘導体を発明するに至った。

ここに、本発明は、（１）未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニスト又はその機能的誘導体を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、（２）レセプター CCR1 又は CCR5 に対するアゴニスト又はその機能的誘導体を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤である。

より具体的には、（３）アゴニストが MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-3 及び MCP-4 から選ばれる樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤、又は（４）アゴニストが MIP-1 $\alpha$ 、RANTES、MARC 及び LCC-1(ref)から選ばれる樹状細胞前駆体の血中

レベル上昇剤であり、(5) アゴニスト又はその機能的誘導体が MIP-1 $\alpha$  又はその機能的誘導体である樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、(6) MIP-1 $\alpha$  の機能的誘導体が BB-10010 である樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤である。

更には、(7) アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾された未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニストである樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、(8) アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾されたレセプター CCR1 又は CCR5 に対するアゴニストである樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、(9) アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾された MIP-1 $\alpha$ 、BB-10010、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-3 又は MCP-4 である樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、(10) アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾された MIP-1 $\alpha$ 、BB-10010、RANTES、MARC 又は LCC-1(ref) である樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、(11) アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾された MIP-1 $\alpha$  又は BB-10010 である樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、(12) アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾された BB-10010 である樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤であり、また、(13) 両親媒性高分子が部分アルキルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体である (7) 乃至 (12) の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤である。

本発明は、更に、(14) 両親媒性高分子で化学修飾された未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニストであり、(15) 両親媒性高分子で化学修飾されたレセプター CCR1 又は CCR5 に対するアゴニストである。

より具体的には、(16) 両親媒性高分子で化学修飾された MIP-1 $\alpha$ 、



BB-10010、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-3 又は MCP-4 であり、(17)両親媒性高分子で化学修飾された MIP-1 $\alpha$  であり、(18)両親媒性高分子で化学修飾された BB-10010 であり、ここで(19)両親媒性高分子が部分アルキルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体又はポリエチレングリコール誘導体である(14)至(18)のアゴニストである。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、B6 マウスへの P.acnes 投与による末梢血への樹状細胞前駆体の誘導における、抗 MIP-1 $\alpha$  抗体の効果を示す。

図 2 は、B6 マウスへの MIP-1 $\alpha$  投与による末梢血への樹状細胞前駆体の誘導活性を経時的に示す。

図 3 は、MIP-1 $\alpha$  により誘導した樹状細胞前駆体を抗原感作したものと T リンパ球を共培養して行った混合リンパ球反応における T リンパ球の増殖の効果を示す。

図 4 は、マウスに接種した腫瘍細胞の増殖における、MIP-1 $\alpha$  により誘導した樹状細胞前駆体を用いたワクチン療法の効果を示す。

図 5 は、MIP-1 $\alpha$  により誘導した樹状細胞前駆体の *in vitro* での腫瘍特異的な傷害 T 細胞の誘導における効果を示す。

図 6 は、MIP-1 $\alpha$  により誘導した樹状細胞前駆体によって誘導された腫瘍特異的な傷害 T 細胞の MHC classI 拘束性の確認実験の結果を示す。

図 7 は、MIP-1 $\alpha$  により誘導した樹状細胞前駆体を用いたワクチン療法の腫瘍細胞のマウス肺転移における効果を示す。

図 8 は、Bu-SMA-BB10010 のフラクション毎の 280nm における吸光度を示す。

図 9 は、Bu-SMA-BB10010 および原料である BB10010 の Native-PAGE 電気泳動の結果を示す。

図 10 は、BB10010 及び Bu-SMA-BB10010 の静脈投与 24 時間後の血中樹状細胞占有率を示す。斜線の棒グラフは B220<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>の場合を、斜線のない棒グラフは B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>の場合を夫々示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

MIP-1 $\alpha$  を用いた本発明者等の研究の結果から、未熟樹状細胞において発現しているレセプターである CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CCR11、CXCR4 等に対するリガンド、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、TARC、MDC、MIP-3 $\alpha$ 、MIP-3 $\beta$ 、LARC、TECK、BLC、SDF-1、Exodus-1、Exodus-2 等について樹状細胞前駆体の血中濃度レベルを上昇させる作用があることが期待される。中でも、本発明者等の研究において樹状細胞の末梢臓器遊走に関係すると考えられる CCR-1 及び CCR-5 に共通するリガンドとして知られている MIP-1 $\alpha$ 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)等が樹状細胞前駆体の血中濃度レベルを上昇させる作用において優れることが期待される。

本発明における有効成分の代表例である MIP-1 $\alpha$  は CC サブファミリーに属するケモカインとして知られており、レセプター CCR-1 や CCR-5 のリガンド(アゴニスト)である。ヒト成熟型 MIP-1 $\alpha$  は 70 のアミノ酸よりなるとされているが、CD8<sup>+</sup>T 細胞や HTLV-1 感染細胞 MT4 培養上清から得られるものは 66 アミノ酸を有することが知られている。ヒト MIP-1 $\alpha$  には、個人により遺伝子コピー数の異なる非対立遺伝子 LD78 $\beta$  が存在し、70 アミノ酸型 MIP-1 $\alpha$  とは配列が 3 残基異なるものが知られている。これ等は何れも本発明において使用でき

る。

本発明で利用できるアゴニストの機能的誘導体とは、未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するリガンドの誘導体であって、アゴニストとしての作用を有する物質を云う。例えば、MIP-1 $\alpha$ の機能的誘導体とは、MIP-1 $\alpha$ の誘導体であって、アゴニストとしてMIP-1 $\alpha$ と同様の生物活性を示すものであり、かかる生物学的同等物の代表例としてBB-10010(既出、European Journal of Cancer, Vol. 14, No. 7, pp. 1023-1029(1998))を挙げることができる。

本発明において樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤として使用されるアゴニストは部分アルキルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体やポリエチレングリコール誘導体で代表される両親媒性高分子で化学的に修飾すると、その活性が維持されると共に、血中安定性が改善されレベル上昇作用が持続すること及びEPR効果によるガン局所への集積が行われることが確認された。アゴニストのガン局所への集積は末梢血中で増加した樹状細胞のガン局所への集積をもたらすことになり、癌の免疫療法における効果を一層高めることになる。かくして、本発明で利用されるアゴニストの機能的誘導体は両親媒性高分子で化学的に修飾されることが好ましく、この様に両親媒性高分子で化学的に修飾されたアゴニスト及びその生物学的同等物も、本明細書において「アゴニストの機能的誘導体」と呼ぶことにする。

本発明においてペプチド性アゴニスト又はその生物学的同等物を化学修飾するために用いられる両親媒性高分子の好ましい例として、部分アルキルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体を挙げることができ、更に、そのアルキル部分の例としては、直鎖または分枝していてもよい炭素数が1乃至5であるアルキル基を挙げることができ、これ等アルキル基は低級アルコキシ基で置換されていても良い。より具体的には、

メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*s*-ブチル、*t*-ブチル、*n*-ペンチル、3-メチル-1-ブチル、2-メチル-1-ブチル、2, 3-ジメチル-1-プロピル、2-ペンチル、3-メチル-2-ブチル、3-ペンチル、2-メチル-2-ブチル、メチルセロソルブ、エチルセロソルブ等を挙げることができる。

好ましい部分アルキルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体の例は、特公平1-33119号に記載されている、部分ブチルエステル化スチレン-マレイン酸共重合体であって、平均分子量が1000~10000で、重合度が1乃至100、好ましくは3乃至35のものが選ばれる。

本発明においてアゴニスト又はその生物学的同等物を化学修飾するために用いられる両親媒性高分子の好ましい他の例として、ポリエチレングリコール(以下PEGと記す場合もある)の誘導体を挙げることができる。ここで、ポリエチレングリコール誘導体とは、 $-O-(CH_2CH_2O)_n-$ で表されるPEG部分(*n*は20乃至280の整数)がアゴニスト又はその生物学的同等物のペプチド鎖と結合し得る残基を有する化合物を意味する。ポリエチレングリコール誘導体の例としては、ペプチド鎖のアミノ基(N末アミノ基、リジン残基のアミノ基)に結合できる残基を有するものを挙げることができる。ポリエチレングリコール誘導体の他の例として、ペプチド鎖のカルボキシル基(C末カルボキシル基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基のカルボキシル基)に結合できる残基を有するものを挙げることができる。

更に、本発明において用いられる両親媒性高分子の他の例として、ポリビニルピロリドンその他を挙げることができる。

本発明に関わる両親媒性高分子で化学修飾されたアゴニスト及びその生物学的同等物は、両親媒性高分子とアゴニスト及びその生物学的同等

物を、場合によりリンカーアームを介して化学結合させ、部分精製することにより得ることができる。即ち、両親媒性高分子とアゴニスト及びその生物学的同等物とを緩衝液中で反応させ、その後カラムクロマトグラフィを用いて精製し、溶出する各フラクションを分離する。

両親媒性高分子が部分アルキルエステル化スチレンーマレイン酸共重合体である場合を例にとり、より具体的に説明すれば、まず、スチレンと無水マレイン酸のラジカル共重合により得られるスチレンーマレイン酸共重合体（SMA）の酸無水物をクメン等の有機溶媒に溶解させ、この溶液にn-ブタノールを攪拌下に滴下して反応させ、部分的に無水環をブチルエステル化することで、部分ブチルエステル化スチレンーマレイン酸共重合体（Bu-SMA）を得ることができる。かくして得られるBu-SMA とアゴニスト又はその生物学的同等物との結合は、両者を pH 8.5 の重炭酸水素ナトリウム 0.3M 溶液中で反応させ、Bu-SMA 中の酸無水環とアゴニスト又はその生物学的同等物中のアミノ基との間にアミド結合を形成させることにより行なうことができる。アゴニスト又はその生物学的同等物に対する Bu-SMA の結合数は1以上であればよく、好ましくは3乃至10、より好ましくは6乃至8である。

両親媒性高分子としてPEGを用いて、アゴニスト又はその生物学的同等物のペプチド鎖のアミノ基を修飾する場合は、PEGの末端に、アミノ基と反応し得る官能基、例えば、カルボキシル基を導入することが好ましい。アゴニスト又はその生物学的同等物のペプチド中のアミノ基に結合させるためには、該官能基を反応性基に変換することが好ましく、カルボキシル基の場合は、活性エステル法、混合酸無水物法等が好ましい例である。

具体的には、活性エステルの場合、p-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル等のフェニルエステル類、N-ヒドロキ

シフタルイミドエステル、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル等のジカルボン酸イミドエステル、N-ヒドロキシピペリジンエステル等のヒドロキシル系活性エステル等が挙げられる。これ等の活性エステルの調製は、常法に従って行うことができ、例えば、PEG誘導体のカルボキシル基と上記の活性エステルに対応するアルコール体とをジシクロヘキシルカルボジイミドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド等の縮合剤を用いて-20℃乃至室温にて1乃至24時間反応させることにより行うことができる。或いは、PEG誘導体のカルボキシル基と上記活性エステルに対応するハロゲン化物とを、トリエチルアミン等の塩基の存在下に、0℃乃至80℃で1乃至72時間反応させることによっても調製することができる。混合酸無水物法の場合は、N-メチルモルホリン、N-エチルピペリジン等の塩基の存在下に、イソブチルクロロホルメート、エチルクロロホルメート、塩化イソバレリル等と-20℃乃至0℃で1乃至30分間反応させることにより調製することができる。

PEG誘導体をアゴニスト又はその生物学的同等物のペプチド鎖に直接導入することもできるが、リンカーアームを介して導入することもできる。例えば、リジンを含む短いアミノ酸配列を目的とするペプチド鎖に導入し、そのリジンのアミノ基をPEG誘導体で修飾する。修飾反応においては、修飾されるペプチド鎖に含まれるアミノ基数に対して10乃至30倍モルのPEG誘導体を用いることが好ましい。

両親媒性高分子としてPEGを用いて、アゴニスト又はその生物学的同等物のペプチド鎖のカルボキシル基を修飾する場合は、PEGの末端に、カルボキシル基と反応し得る官能基、例えば、アミノ基を導入することが好ましい。

かくして得られる両親媒性高分子で化学修飾されたペプチド性アゴ

ニスト又はその生物学的同等物は、所謂、EPR 効果により固形腫瘍等の標的患部へと選択的に集積することが期待される。

本発明に関わる樹状細胞の血中レベル上昇剤は、有効成分であるアゴニスト又はその機能的誘導体、即ちタンパク質を非経口的に投与するのが好ましく、例えば、水、若しくはそれ以外の薬学的に許容し得る液体との無菌性溶液又は懸濁液などの注射剤の形で投与されることが好ましい。注射の為の無菌組成物は注射用水のようなビヒクル、天然植物油などを用いて有効成分を溶解又は懸濁させるなどの通常の製剤手段に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、ヤシ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。

本発明で得られる Bu-SMA が結合したアゴニスト又はその生物学的同等物は、水溶性または油性注射剤の形で用いることができる。水溶性注射剤は主に静脈内投与に使用される。油性注射剤は、例えば、リピドールなどの油剤に均一に分散させた Bu-SMA が結合したアゴニスト又はその生物学的同等物を腫瘍栄養動脈上流に固定したカテーテル

により腫瘍組織等の標的患部に投与される。Bu-SMA が結合したアゴニスト又はその生物学的同等物が血中でアルブミンと結合して高分子化合物として挙動すること及び Bu-SMA 結合物が油剤に可溶となることが本発明者等により見出されており、その結果、油剤化された Bu-SMA 結合アゴニスト又はその生物学的同等物を局所動脈に注射すれば、所謂、EPR 効果により固形腫瘍等の標的患部へと選択的に集積することが期待される。

このようにして得られる製剤は、例えば、ヒトまたは哺乳動物対して投与することができる。本発明の有効成分の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、非経口的に投与する場合の該有効成分の 1 回投与量は、例えば、成人（体重 60 kg として）に投与する場合、一回につき約 0.01～10 mg 程度、好ましくは約 0.1～5 mg 程度である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

#### 参考例 1

P.acnes による血中への樹状細胞前駆体の誘導と抗 MIP-1 $\alpha$  抗体による誘導抑制

B6 マウス（雌、8-10 週齢、クレア社製）に P.acnes（1 mg/匹；American Type Culture Collection 118289）を尾静脈より投与して、血中に樹状細胞前駆体を誘導した。P.acnes 投与の 6 時間前に、その内の一群に機能抑制活性を有する抗 MIP-1 $\alpha$  抗体（ヤギポリクローナル抗体；100  $\mu$ g/ $\mu$ l；Genzyme/Techne 社製）を尾静注した。陰性対照としてヤギ IgG（Sigma-Aldrich 社製）を同様にして投与した。

P.acnes 投与の 3 日後に各マウスより採取したヘパリン採血液をナイコプレップ（Axis-Shield 社製）で分離して末梢血単核球を採取した。該末梢血単核球を FITC 標識抗 CD11c 抗体（クローン HL3；ファーマ



ンジェン社製) および PE (フィコエリスリン) 標識抗 B220 抗体 (クローン RA3-6B2 ; ファーミンジェン社製) で 4℃ で反応させた後、フローサイトメーター (EPICS-Elite、コールター社製) によって解析した。B220 抗原陰性、CD11c 抗原陽性細胞を樹状細胞前駆体として、末梢血単核球における樹状細胞前駆体の割合を算出した。結果を図 1 に示す。図 1 において「PBS」は、対照として PBS のみを投与した群の結果である。

P.acnes 投与により、非投与群に比べ末梢血単核球における樹状細胞前駆体の割合が劇的に上昇した。このことは血液中に樹状細胞前駆体が誘導されたことを示している。抗 MIP-1 $\alpha$  抗体の投与群では、P.acnes 投与による末梢血単核球における樹状細胞前駆体の出現頻度の上昇が、約半分に抑制されることが確認された。

## 参考例 2

### MIP-1 $\alpha$ の製法

ヒト MIP-1 $\alpha$  遺伝子を PCR 法により取得した。該ヒト MIP-1 $\alpha$  遺伝子を発現シャトルベクター pNCMO2 に組み込み、大腸菌にて増幅した。該ヒト MIP-1 $\alpha$  遺伝子発現ベクターを *Brevibacillus choshinensis* (*B. choshinensis*) HPD31S5 に導入した。該ヒト MIP-1 $\alpha$  遺伝子導入 *B. choshinensis* を培養して、その上清を採取した。該培養上清に 40% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、沈殿生成後、遠心にて上清を分離して、さらに 60% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、沈殿生成後遠心にて該沈殿物を回収した。該沈殿物をトリス塩酸バッファー (pH 8.0) に溶解し、該溶解物を陰イオン交換クロマトグラフィー (Q Sepharose; アマーシャム社製) にかけて分画した。各画分のうち MIP-1 $\alpha$  を含む画分を集め、硫酸アンモニウムを加えて溶解した (終濃度 1.5M)。該溶解物を疎水性クロマトグラフィー

(RESOURCE PHE; アマーシャム社製) にかけて分画した。各画分のうち MIP-1 $\alpha$ を含む画分(非吸着画分)を集め、硫酸アンモニウムを加えて硫酸沈殿を行った(終濃度 60%飽和)。沈殿物をトリス塩酸バッファー(pH 8.0)に溶解し、該溶解物を再度陰イオン交換クロマトグラフィー(RESOURCE Q; アマーシャム社製)にかけて分画した。各画分のうち MIP-1 $\alpha$ を含む画分を集め、トリス塩を除く目的で 20mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 8.5) に対して透析を行った。この処理により生じた沈殿を遠心することにより精製ヒト MIP-1 $\alpha$ を得た。これを凍結乾燥後 PBS に溶解させ、以下の実験に用いた。

### 参考例 3

#### BB10010 の製法(発現と精製)

BB10010 の cDNA は、ヒト MIP-1 $\alpha$  cDNA をテンプレートとし Quik Change Kit (Stratagene 社)を用いて、部位特異的変異により調製した。すなわち、125ng の変異プライマー RQ1:5' - CCAGCGAAGCCGGCAGGTCTGTGCTGACCCAG-3' (配列番号 1)、RQ2:5' - CTGGGGTCAGCACAGACCTGCCGGCTTCGCTTGG -3' (配列番号 2)、テンプレートプラスミド DNA10ng に 50  $\mu$ M dNTP を含む 50  $\mu$ l の反応系に Pfu-turbo(2.5U/ $\mu$ l)1  $\mu$ l 添加し、95°C 30 秒の変性に続き、95°C 30 秒、55°C 1 分、68°C 7 分を 12 サイクルおこなった後、反応系に制限酵素 DpnI を 1  $\mu$ l 添加し、37°C で 1 時間反応することによりテンプレート DNA を切断することにより、変異プラスミドのみを回収した。変異部位が正しく置換されたことを DNA 配列解析により確認した後、MIPM2 プライマー 5' - CATGCCATGGCTTTCGCTTC ACTTGCTGCTGACAC (配列番号 3)および MIPRV プライマー 5' - CGCGGATCCTCAGGCACTCAGCTCTAG (配列番号 4)を用いて通常の PCR を行い、制限酵素 NcoI 及び BamHI で切断後、パチルスプレビス発現ベクター pNCM02 の同制限酵素サイトに挿入した。

これを *Brevibacillus chonshinensis* HPD31 株を形質転換し、30℃、3日間、TMN 培地でジャーファーマンターにて 20L 培養し、分泌発現させた。この培地上清を 0.45 $\mu$ m のフィルターにてろ過除菌し精製の出発材料とした。この培地上清に 10 倍濃度のリン酸緩衝液 (0.1M Na-phosphate) を添加し、最終 pH7.0 とし、10mM リン酸緩衝液 (pH7.0) で平衡化したヘパリンカラム (5ml サイズ、アマシャムバイオサイエンス社) に、AKTA-prime システム (アマシャムバイオサイエンス社) を用いて 5ml/min で送液し BB10010 を吸着させた。溶出は 1M 塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 (pH6.5) をグラジエントで添加し行った。BB10010 溶出画分は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にて確認した。ピーク画分は、50mM ギ酸緩衝液 (pH4.0) に対して透析した。続いて陽イオン交換クロマト SP-FF (1ml サイズ、アマシャムバイオサイエンス社) に 1 ml / min にて送液し、BB10010 を吸着させた。溶出は 1M 塩化ナトリウムを含むギ酸緩衝液 (pH3.8) をグラジエントで添加し行った。BB10010 溶出画分は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にて確認した。ピーク画分は、ゲルろ過クロマトグラフィー (充填剤: バイオラッド社製 Bio-GelP60、移動相: 20mM 重炭酸水素アンモニウム溶液 (pH8.5)、カラムサイズ: 1.6 $\times$ 83cm) に付して BB10010 を精製した。そのピーク画分を凍結乾燥した。

#### 実施例 1

##### MIP-1 $\alpha$ のマウス血中への樹状細胞前駆体誘導活性

B6 マウス (雌、8-10 週齢、クレア社製) に参考例 2 の製法により得られた精製 MIP-1 $\alpha$  (5  $\mu$ g/匹) を尾静脈より投与して、血中に樹状細胞前駆体を誘導した。MIP-1 $\alpha$  投与の 4,8,16,24,48,72 時間後に該マウスより採取したヘパリン採血液を参考例 1 と同様にフローサイトメーターによって解析して、末梢血単核球における樹状細胞前駆体の割合を

算出した。

結果を図 2 に示す。図において□の折れ線グラフが示すように、MIP-1 $\alpha$  投与により、短時間のうちに末梢血単核球における樹状細胞前駆体(B220<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>cells)の割合が劇的に上昇し、投与後 8 時間でピークに達し (12.45 %  $\pm$  0.49)、該ピークは 24 時間後まで持続した。MIP-1 $\alpha$  投与前(図 2 の時間がゼロの時点)における樹状細胞前駆体の濃度が 0.5 乃至 1 %であったことから、12 乃至 24 倍のオーダーで血中レベルが上昇したことが明らかである。

更に、図 2 において◇の折れ線グラフが示すように、MIP-1 $\alpha$  投与により、末梢血単核球における樹状細胞前駆体(B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>cells)の割合が上昇し、投与後 8 時間でピークに達し、該ピークは 24 時間後まで持続した。最近における本発明者等の研究によれば、プラズマ細胞系の樹状細胞前駆体である B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>cells は、炎症リンパ節における高内皮性細静脈(high endothelial venules)に E セレクチン及び CXCL9 に依存して直接結合すると共に遊出し、骨髄性樹状細胞である B220<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>cells の機能をサポートすることが確認されている。また、B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>cells はインターフェロン $\gamma$ を産生しキラー細胞の活性化を促すことも本発明者等により明らかにされている。これ等の諸知見から、末梢血における B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>cells のレベル上昇は樹状細胞による免疫療法において重要な意味をもたらすものである。

## 実施例 2

MIP-1 $\alpha$  によってマウス血中へ誘導された樹状細胞前駆体の機能解析

MIP-1 $\alpha$  によってマウス血中へ誘導された樹状細胞前駆体が P.acnes により誘導された樹状細胞前駆体と同様の性状を有するかを解析する目的で以下の実験を行った。

### <1>末梢血由来樹状細胞前駆体の調整

B6 マウス（雌、8・10 週齢、クレア社製）に P.acnes 死菌（1 mg/匹）又は参考例 2 の製法で得られた精製 MIP-1 $\alpha$ （5  $\mu$ g/匹）を尾静脈より投与した。P.acnes 死菌投与後 3 日目あるいは MIP-1 $\alpha$  投与後 16 時間目に該マウスより麻酔下にて心臓からヘパリン採血を行った（0.8 ml/匹）。該ヘパリン採血液をナイコブレップで分離して末梢血単核球を採取した。該末梢血単核球を FITC 標識抗 CD11c 抗体および PE 標識抗 B220 抗体で 4℃で 30 分反応させた後、セルソーター（EPICS-Elite、コールター社製）により B220 抗原陰性、CD11c 抗原陽性細胞を分離した。該分離細胞を GM-CSF（4 ng/ml; Kirin Brewery 社製）と IL-4（10 ng/ml; Genzyme/Thech 社製）存在下で 5 日間培養したものを末梢血由来樹状細胞前駆体とした。

#### <2> 骨髄由来樹状細胞前駆体の調整

B6 マウスの大腿骨および脛骨より骨髄細胞を採取した。該骨髄細胞をナイコブレップで分離して骨髄単核球を採取した。該骨髄単核球をシャーレで 10・12 時間培養し、非付着骨髄単核球を回収した。該非付着骨髄単核球を磁気ビーズ標識 c-kit 抗体と混合培養し、磁気細胞ソーター（MACS; MiltenyiBiotec 社製）にて c-kit 陽性細胞を分離した。該 c-kit 陽性細胞を 2.5 x 10<sup>5</sup> cells/ml の濃度にて、SCF(須藤先生 (Toray 社) より供与)、Flt3L (Immunex 社製)、GM-CSF（4 ng/ml）と IL-4（10 ng/ml）存在下で 7・9 日間培養したものを骨髄由来樹状細胞前駆体とした。該 c-kit 陽性細胞を 2.5 x 10<sup>5</sup> cells/ml の濃度にて、SCF(須藤先生 (Toray 社) より供与)、Flt3L (Immunex 社製)、GM-CSF（4 ng/ml）と IL-4（10 ng/ml）存在下で 7・9 日間培養したものを骨髄由来樹状細胞前駆体とした。

#### <3> 樹状細胞前駆体の抗原感作

抗原となる癌細胞株の可溶化物は、癌細胞を凍結・溶解を 3 回繰り

返すことにより調製した。該末梢血由来樹状細胞前駆体（P.acnes 死菌あるいは精製 MIP-1 $\alpha$  投与マウス由来）および該骨髓由来樹状細胞前駆体と該癌細胞株可溶化物を樹状細胞前駆体：癌細胞が 1：3 になるように混合し、20 時間培養した。該癌細胞株可溶化物感作樹状細胞前駆体を回収し、マイトマイシン C（10  $\mu$ g/ml）にて処理を行った後、2 回洗浄したものを抗原感作樹状細胞前駆体とした。

#### < 4 > 抗原感作樹状細胞前駆体による T リンパ球増殖反応測定

B6 マウス脾臓細胞より、磁気細胞ソーター（MACS; MiltenyiBiotec 社製）を用いて CD3 陽性 T リンパ球を調製した。該 T リンパ球と該抗原感作樹状細胞前駆体（B16 癌細胞株可溶化物で感作した骨髓由来樹状細胞前駆体）の比が 1：20 になるように混合し、IL-2、IL-7 の存在下で 24 穴プレートにて培養した。該培養 T リンパ球を 5 日間培養後、2-3 日おきに 50%の培地を新鮮なものと交換することにより培養を継続した。7 および 14 日目に該抗原感作樹状細胞前駆体を新たに加えることにより、該培養 T リンパ球の再感作を行った。培養 21 日目に該培養 T リンパ球を回収した。次いで 96 穴丸底培養プレート（Nunc 社製）を用いて、該培養 T リンパ球を MMC 処理した B16 癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体（P.acnes 死菌あるいは精製 MIP-1 $\alpha$  投与マウス由来）、B16 癌細胞株可溶化物で感作した該骨髓由来樹状細胞前駆体、EL4 癌細胞株可溶化物で感作した該樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体あるいは癌細胞株可溶化物のみと混合し、37°C で 4-5 日間培養した。培養後、5 mg/ml の MMT（3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide）溶液を 15  $\mu$ l / 穴加え、37°C で 4 時間培養した。培養後、各穴の 550 nm の吸光度を測定することにより、該 T リンパ球の増殖を測定した。

結果を図 3 に示す。B16 癌細胞株可溶化物で感作した精製 MIP-1 $\alpha$

投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体は、*P.acnes* 死菌投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体あるいは骨髓由来樹状細胞前駆体と同様に該培養 T リンパ球の増殖を増強した。一方、EL4 癌細胞株可溶化物で感作した該樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体あるいは癌細胞株可溶化物のみではこのような該培養 T リンパ球の増殖の増強活性は認められなかった。

#### < 5 > マウスの腫瘍増殖における免疫の効果の検討

B6 マウスのグループ (8 匹/グループ) それぞれに、0 日目、7 日目の 2 回、B16 癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体 (*P.acnes* 死菌あるいは精製 MIP-1 $\alpha$  投与マウス由来)、B16 癌細胞株可溶化物で感作した該骨髓由来樹状細胞前駆体、EL4 癌細胞株可溶化物で感作した該樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体 (各 1 x 10<sup>6</sup>/マウス)、癌細胞株可溶化物のみあるいは PBS を腹側の皮下に注入した。14 日後に該マウスの腹側の皮下に B16 癌細胞 (2 x 10<sup>5</sup>/マウス) を接種した。接種後 3 日おきに、腫瘍の面積を測定し、腫瘍の増殖を判定した。同時にマウスの生存日数も観察した。

結果を図 4 に示す。B6 マウスを B16 癌細胞株可溶化物で感作した精製 MIP-1 $\alpha$  投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体により免疫することにより、皮下に接種した B16 癌細胞の増殖が著明に抑制された。また 50% (5/10) のマウスにおいては、腫瘍の消失が観察され、60 日以上の生存の延長が確認された。この効果は、*P.acnes* 死菌投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体あるいは骨髓由来樹状細胞前駆体と同等であった。一方、EL4 癌細胞株可溶化物で感作した該樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体あるいは癌細胞株可溶化物のみで免疫したマウスは、癌接種後 20 日以内に全例が死亡した。

#### < 6 > 腫瘍特異的細胞傷害活性の測定

上記<4>と同様の方法により、B6 マウス脾臓細胞より CD3 陽性 T リンパ球を調製し、B16 癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体 (P.acnes 死菌あるいは精製 MIP-1 $\alpha$  投与マウス由来)、B16 癌細胞株可溶化物で感作した該骨髓由来樹状細胞前駆体、あるいは癌細胞株可溶化物のみと混合培養することにより培養 T リンパ球を調製した。96 穴プレートに該培養 T リンパ球を連続希釈したものを 100  $\mu$ l/穴ずつ加えた。次に B16 癌細胞株の細胞浮遊液を 100  $\mu$ l/穴ずつ加えた。該プレートを 37°C、10 時間培養した。該プレートを遠心後、上清 100  $\mu$ l/穴を新たな 96 穴プレートに移した。各穴に Cytotoxicity Detection Kit (LDH; ベーリンガーマンハイム社製) の反応液を 100  $\mu$ l/穴ずつ加えた。該反応プレートを室温で 30 分反応させた後、プレート吸光度測定装置にて 490 nm の吸光度を測定した。

結果を図 5 に示す。B16 癌細胞株可溶化物で感作した精製 MIP-1 $\alpha$  投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体と混合培養した T リンパ球は、効率的に B16 癌細胞を傷害したが、EL4 癌細胞は傷害しなかった。B16 癌細胞株可溶化物で感作した P.acnes 死菌投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体あるいは骨髓由来樹状細胞前駆体で混合培養した T リンパ球も同様に B16 癌細胞を傷害した。しかし一方、癌細胞株可溶化物のみと混合培養した T リンパ球は、B16 癌細胞を傷害しなかった。<7>上記<5>において、B16 癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体 (MIP-1 $\alpha$  投与マウス由来) あるいは該骨髓由来樹状細胞前駆体で免疫した B6 マウスのうち、B16 癌細胞株接種後 60 日目に癌細胞が消失していたものについて、該マウスより脾臓細胞を採取した。該脾臓細胞の CD8 陽性 T リンパ球を分離して ( $1 \times 10^6$ )、MMC 処理した B16 癌細胞株 ( $1 \times 10^5$ ) と 5 日間培養した。96 穴プレートに該培養 T リンパ球を連続希釈したものを 100  $\mu$ l/穴ずつ加え



た。次に B16 癌細胞株の細胞浮遊液を  $100\ \mu\text{l}$ /穴ずつ加えた。該プレートを  $37^{\circ}\text{C}$ 、10 時間培養した。該プレートを遠心後、上清  $100\ \mu\text{l}$ /穴を新たな 96 穴プレートに移した。各穴に Cytotoxicity Detection Kit (LDH; ベーリンガーマンハイム社製) の反応液を  $100\ \mu\text{l}$ /穴ずつ加えた。該反応プレートを室温で 30 分反応させた後、プレート吸光度測定装置にて  $490\ \text{nm}$  の吸光度を測定することにより細胞傷害活性を測定した。MHC classI 機能阻害実験の場合は、B16 癌細胞を抗 MHC classI 抗体 (抗 H2Kb/H2Db 抗体) あるいはコントロール抗体 (抗 H2Dd 抗体) で添加前  $37^{\circ}\text{C}$ 、30 分間、処理した。

図 6 に結果を示す。該培養 T リンパ球は、効率的に B16 癌細胞を傷害したが、EL4 癌細胞は傷害しなかった。またこの活性は、該培養 T リンパ球を抗 MHC classI 抗体で処理することにより完全に抑制された。しかしコントロール抗体では、このような効果はみられなかった。

< 8 > B6 マウスに、0 日目、7 日目の 2 回、B16 癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体 (P.acnes 死菌あるいは精製 MIP-1 $\alpha$  投与マウス由来)、B16 癌細胞株可溶化物で感作した該骨髓由来樹状細胞前駆体、EL4 癌細胞株可溶化物で感作した該樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体 (各  $1 \times 10^6$ /マウス)、癌細胞株可溶化物のみあるいは PBS を腹側の皮下に免疫した。二回目の免疫後 7 日目に、該免疫マウスより脾臓細胞を採取した。該脾臓細胞よりセルソーターを用いて CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞 T 細胞を分離した。該 T 細胞を MMC 処理した B16 癌細胞と混合し、24 穴プレートを用いて 48 時間培養した。該培養細胞を用いて、細胞傷害活性を測定した。また該培養細胞の上清中の IFN $\gamma$  濃度を IFN $\gamma$  ELISA システム (エンドジェン社製) を用いて測定した。

< 9 > 肺転移における効果の確認

B6 マウスの尾静脈より B16 癌細胞 ( $1 \times 10^6$ /マウス) を注入した。癌細胞注入後 3 日目, 7 日目に、B16 癌細胞株可溶化物で感作した該末梢血由来樹状細胞前駆体 (MIP-1 $\alpha$  投与マウス由来)、B16 癌細胞株可溶化物で感作した該骨髓由来樹状細胞前駆体、未感作該樹状細胞前駆体 (各  $1 \times 10^6$ /マウス)、癌細胞株可溶化物のみあるいは PBS をそれぞれ尾静脈より注入した。癌細胞注入後 21 日目にマウス肺を摘出して、癌転移巣の数を測定して転移の程度を判定した。

結果を図 7 に示す。データは、各グループ 3 匹のマウスの平均値で表している。B16 癌細胞株可溶化物で感作した精製 MIP-1 $\alpha$  投与マウス由来末梢血由来樹状細胞前駆体および骨髓由来樹状細胞前駆体で癌接種後免疫を行ったマウスでは、B16 癌細胞の肺への転移が劇的に抑制された。しかし混合培養した T リンパ球も同様に B16 癌細胞を傷害した。しかし未感作該樹状細胞前駆体で免疫したマウスでは、このような転移抑制効果はみられなかった。

### 実施例 3

#### Bu-SMA 結合 BB10010 の製法

参考例 3 で得られた BB10010 を濃度が 2mg/ml となるように、0.8M 重炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH8.5) に溶解させた。この溶液 1ml に対し、ジエチルホルムアミドに溶解した Bu-SMA 2.6mg (モル比にして、Bu-SMA:BB10010=10:1) を徐々に加え、一晚、27 度で反応させた。反応終了後、反応混合物をゲルろ過クロマトグラフィー (充填剤: バイオラッド社製 Bio-GelP60、移動相: 20mM 重炭酸水素アンモニウム溶液 (pH8.5)、カラムサイズ: 1.6 $\times$ 83cm) に付して Bu-SMA 結合 BB10010 を精製した。2ml ごとに 90 本の試験管に分離した (図 8)。次いで、280nm における吸光度に基づき、試験管番号 16~18 に溶出した画分 (6ml) を凍結乾燥させて白色粉末状の Bu-SMA 結合 BB10010 (以下にお

いて、「Bu-SMA-BB10010」と表示する)を得た。

得られた Bu-SMA-BB10010 および原料である BB10010 の Native-PAGE (未変性 10-20%グラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動) の結果を図 9 に示す。両者の泳動距離は、明らかに異なっている。これは、BB10010 のリジンのアミノ基が SMA によって修飾されたことにより表面のプラスチャージが減少し、より陽極側に泳動されやすくなったためと考えられる。この両者の泳動距離の差およびフラクション No.16~18 の Bu-SMA-BB10010 と、未反応の Bu-SMA および BB10010 のアミノ基を蛍光試薬 Fluorescamine(0.3mg/ml in acetone)と反応させ、分光蛍光計で、励起波長 390nm、蛍光波長 475nm で測定し、定量し、1分子に2~3 個の SMA が結合しているの見積もられた。

#### 実施例 4

健常人から 80ml 採血し、Polymorphprep(第一科学)と共に 1600rpm で 20℃、35 分遠心し単核球層を分離した。リンパ球、好中球を除くため、プラスチック吸着法を利用した。すなわち、あらかじめ 10%FCS を含む RPMI 1640(SIGMA)で 37℃ 30 分間コートした細胞培養ディッシュに単核球層を 10%FCS を含む RPMI1640 で  $2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> に調整し浮遊させ、37℃ CO<sub>2</sub> 分圧下で 1 時間置き単核球をディッシュに付着させた。培養液を除いた後、あらかじめ 37℃ に加温した 1%FCS を含む RPMI1640 で 2 回ディッシュを洗浄し、4℃ 1%FCS を含む RPMI1640 を加え氷上に 30 分静置した。その後ピペティングにより単核球を回収し、単球浮遊液を 1600rpm 4℃遠心分離した。上清を除去した後、1%FCS を含む RPMI1640 で  $1 \times 10^6$  個/ml に調整した。この 50ul を 46 穴ケモタキシスチャンバー(家田貿易)の上室に置き、下室に走化性因子を置き CO<sub>2</sub> 分圧下に 90 分置いた。境界のメンブレンフィルターはポアサイズ 5um を使用した。Diff Quick

(国際試薬株式会社) I 液 10 秒、II 液 10 秒により染色し、顕微鏡下にて染色細胞をカウントした。その結果、Bu-SMA-BB10010 を含有するフラクションは、その濃度に依存して単球走化性活性を示し、その活性は、未修飾 BB10010 の約 100 分の 1 の濃度で 2 倍以上の活性を示した。このことから、BB10010 は Bu-SMA で化学修飾されても生物活性を保持していること及びその活性が未修飾のものよりも高いことが確認された。

#### 実施例 5

Bu-SMA-BB10010 の血中への樹状細胞動因作用と BB10010 との比較実験を次の如く行った。BALB/c マウス(9 週令 雄：セアック吉富)の尾静脈より、Bu-SMA-BB10010 (フラクション No.16~18) 200ug/200ul、または、未修飾 BB10010 を 200ug/200ul 投与し、24 時間後に腸間膜静脈より静脈血を採取した。得られた単核球を PBS(-)+2%FCS に  $5 \times 10^5$  cells / 50  $\mu$ l に調整し、FITC 標識抗 CD11c 抗体 (FITC CONJUGATED HAMSTER ANTIMOUSE CD11c:Pharmlngen) および PRE 標識抗 B220 抗体 (R-PE CONJUGATED RAT ANTIMOUSE 45R/B220:Pharmlngen)をそれぞれ 25 倍、200 倍に希釈し、氷上で 1 時間、遮光条件下で反応させた後、FACS(BECTON DICKINSON 社製)にて表面抗原が蛍光標識された細胞数の割合を測定し、数値化した (図 10)。

その結果、単核球に占める CD11c(+) B220(-)細胞群の割合は、対照群が  $2.52 \pm 0.34\%$  のところ、Bu-SMA-BB10010 投与群では、 $11.45 \pm 2.59\%$  であり、4.5 倍に上昇し、未修飾 BB10010 投与群の  $6.65 \pm 0.78\%$  と比較し 1.7 倍上昇しており、SMA 修飾により血中安定性の増大等が影響し、血中への樹状細胞動因作用の増強効果が認められた。また CD11c(+)B220(+)細胞群の割合も、対照群  $1.19 \pm 0.13\%$  に対し、

Bu-SMA-BB10010 投与群では、 $5.14 \pm 2.12\%$ であり、4.3 倍に上昇し、未修飾 BB10010 投与群の  $2.12 \pm 0.69\%$  と比較し 2.4 倍上昇しており、同様にこれら細胞群の血中への動因作用の増強が認められた。

#### 産業上の利用可能性

肝では Kupffer cell が MIP-1 $\alpha$ を産生すること、及び DC 前駆細胞はそれに対応するレセプターCCR5 を発現していることが報告されている(J. Exp. Med., 193:35-49(2001))。これらの事実に基づき、炎症が一度起これば、樹状細胞の前駆細胞が、免疫応答の必要性の有無に関わらず、好中球並みの速さで抗原の探索に駆けつけ、抗原が存在する場合は最短時間で免疫応答を惹起し、生体のリスクを減らすことになるとの推定がなされている(医学の歩み Vol. 200, No.6, 472-476 (2002))。

また、末梢血中には樹状細胞に分化する幹細胞である CD34<sup>+</sup>細胞が存在し、これが MIP-1 $\alpha$ により動員されることも報告されている。更に、CD34<sup>+</sup>細胞を *in vitro* で培養し増殖させるために MIP-1 $\alpha$ を用い得ることが知られている(USP 5922597(1999))。

しかし、生体外から投与した MIP-1 $\alpha$ が DC 前駆細胞の血中への動員に直接的に寄与することは知られておらず、しかも、血中に存在する樹状細胞前駆細胞の濃度レベルが少なくとも数十倍のオーダーで上昇するということは、本発明者等により初めて見出されたことである。

更に、本発明により血中におけるレベルが上昇した樹状細胞前駆体が、生体内で十分なワクチン効果を奏することは実施例 2 において詳述した通りである。

MIP-1 $\alpha$ の生物学的同等物を両親媒性高分子で化学的に修飾することにより、樹状細胞前駆体の動員活性効果が顕著に増加した。このことから、他のアゴニスト及びその生物学的同等物についても同様な効果が期

待される。

かくして本発明により、患者から十分な量の樹状細胞前駆体を採取することが可能となり、樹状細胞による免疫療法の実用化への道が拓かれたとすることができる。

## 請求の範囲

1. 未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニスト又はその機能的誘導体を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤
2. レセプターCCR1又はCCR5に対するアゴニスト又はその機能的誘導体を有効成分とする樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤
3. アゴニストがMIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-3及びMCP-4から選ばれる請求項2記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤
4. アゴニストがMIP-1 $\alpha$ 、RANTES、MARC及びLCC-1(ref)から選ばれる請求項2記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤
5. アゴニスト又はその機能的誘導体がMIP-1 $\alpha$ 又はその機能的誘導体である請求項2記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤
6. MIP-1 $\alpha$ の機能的誘導体がBB-10010である請求項5記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤
7. アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾された未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニストである請求項1記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤
8. アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾されたレセプターCCR1又はCCR5に対するアゴニストである請求項2記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤
9. アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾されたMIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-3又はMCP-4である請求項2記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤
10. アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾されたMIP-1 $\alpha$ 、BB-10010、RANTES、MARC又はLCC-1(ref)である請求

項 2 記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

11. アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾された MIP-1 $\alpha$  又は BB-10010 である請求項 2 記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

12. アゴニストの機能的誘導体が両親媒性高分子で化学修飾された BB-10010 である請求項 2 記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

13. 両親媒性高分子が部分アルキルエステル化スチレンーマレイン酸共重合体である請求項 7 乃至 12 記載の樹状細胞前駆体の血中レベル上昇剤

14. 両親媒性高分子で化学修飾された未熟樹状細胞において発現しているレセプターに対するアゴニスト

15. 両親媒性高分子で化学修飾されたレセプター CCR1 又は CCR5 に対するアゴニスト

16. 両親媒性高分子で化学修飾された MIP-1 $\alpha$ 、BB-10010、MIP-1 $\beta$ 、RANTES、MARC、LCC-1(ref)、MCP-3 又は MCP-4 又はである請求項 15 記載のアゴニスト

17. 両親媒性高分子で化学修飾された MIP-1 $\alpha$  である請求項 15 記載のアゴニスト

18. 両親媒性高分子で化学修飾された BB-10010 である請求項 15 記載のアゴニスト

19. 両親媒性高分子が部分アルキルエステル化スチレンーマレイン酸共重合体又はポリエチレングリコール誘導体である請求項 14 乃至 18 記載のアゴニスト



Fig.1

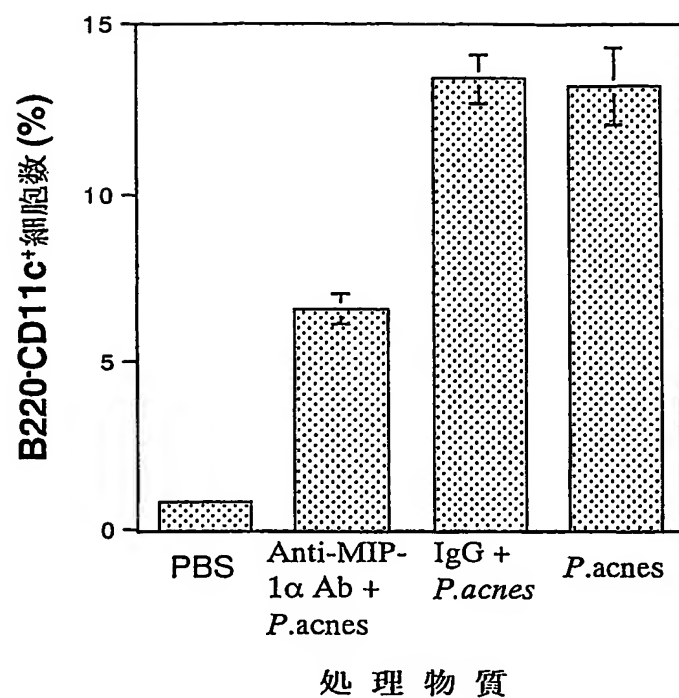


Fig.2

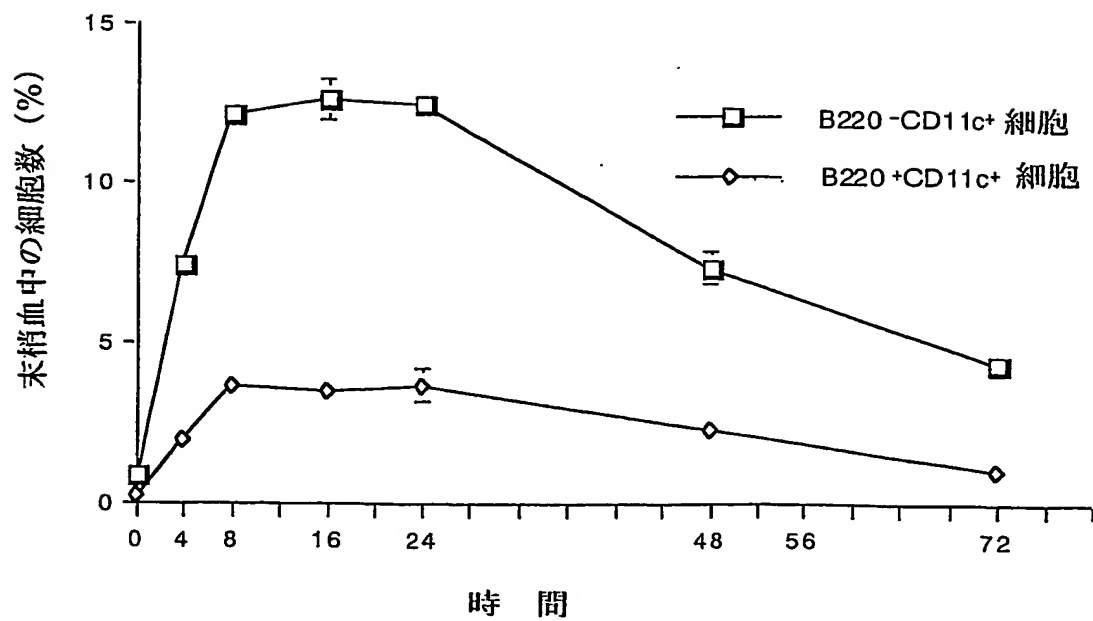


Fig.3

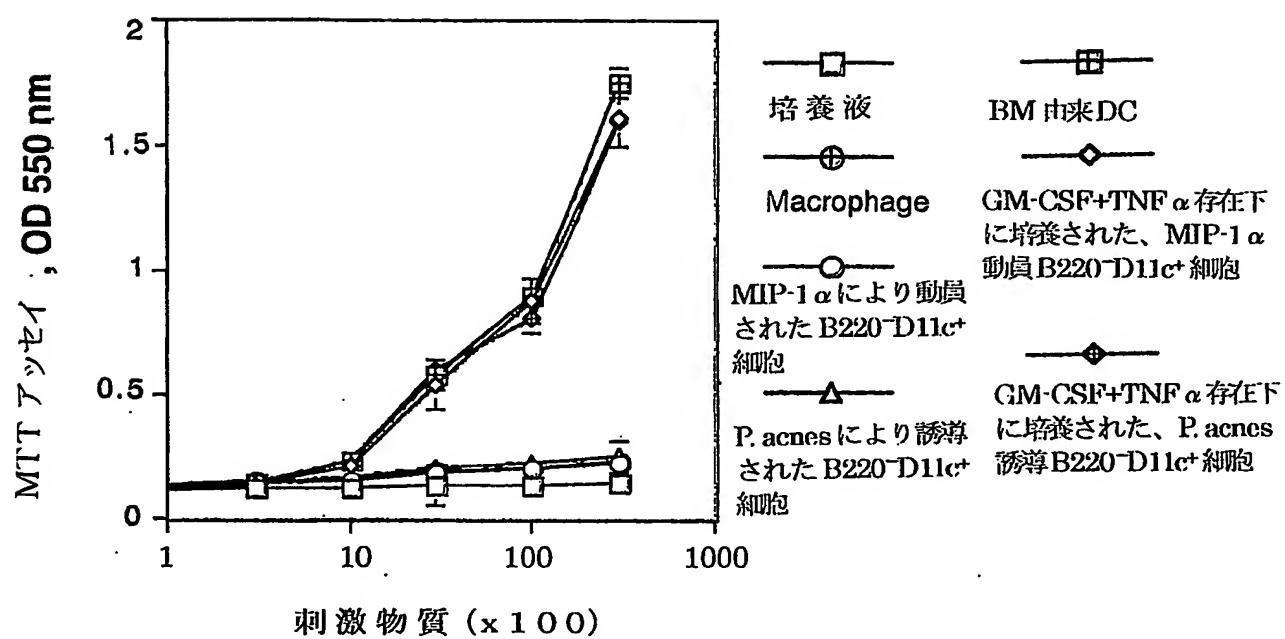


Fig.4

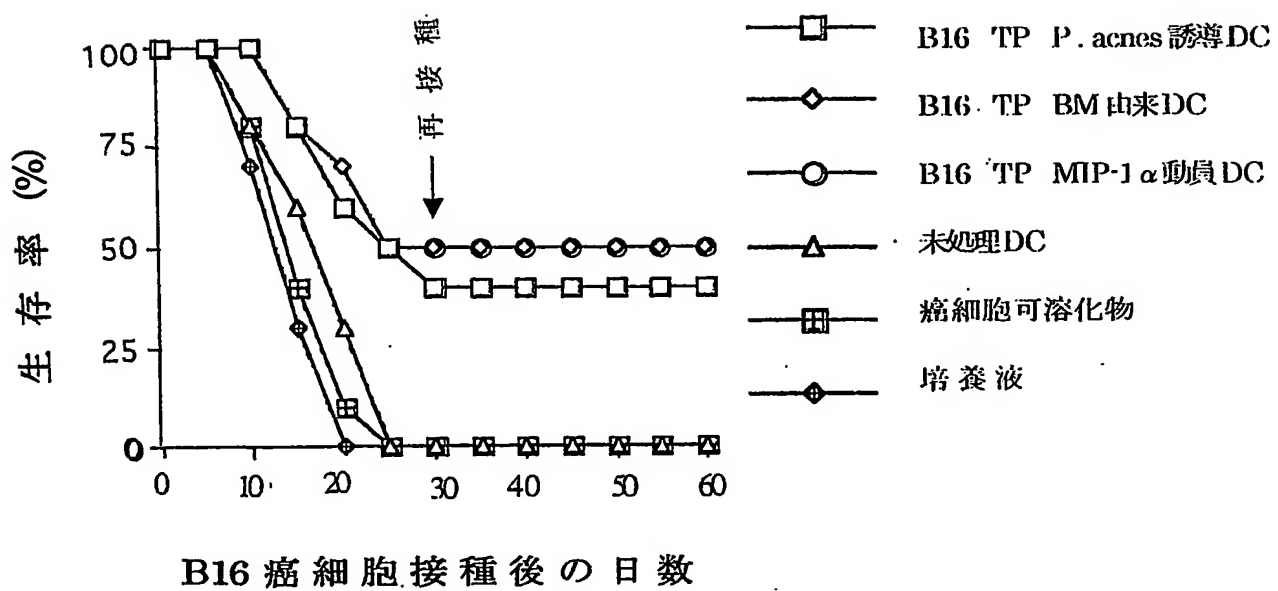


Fig.5

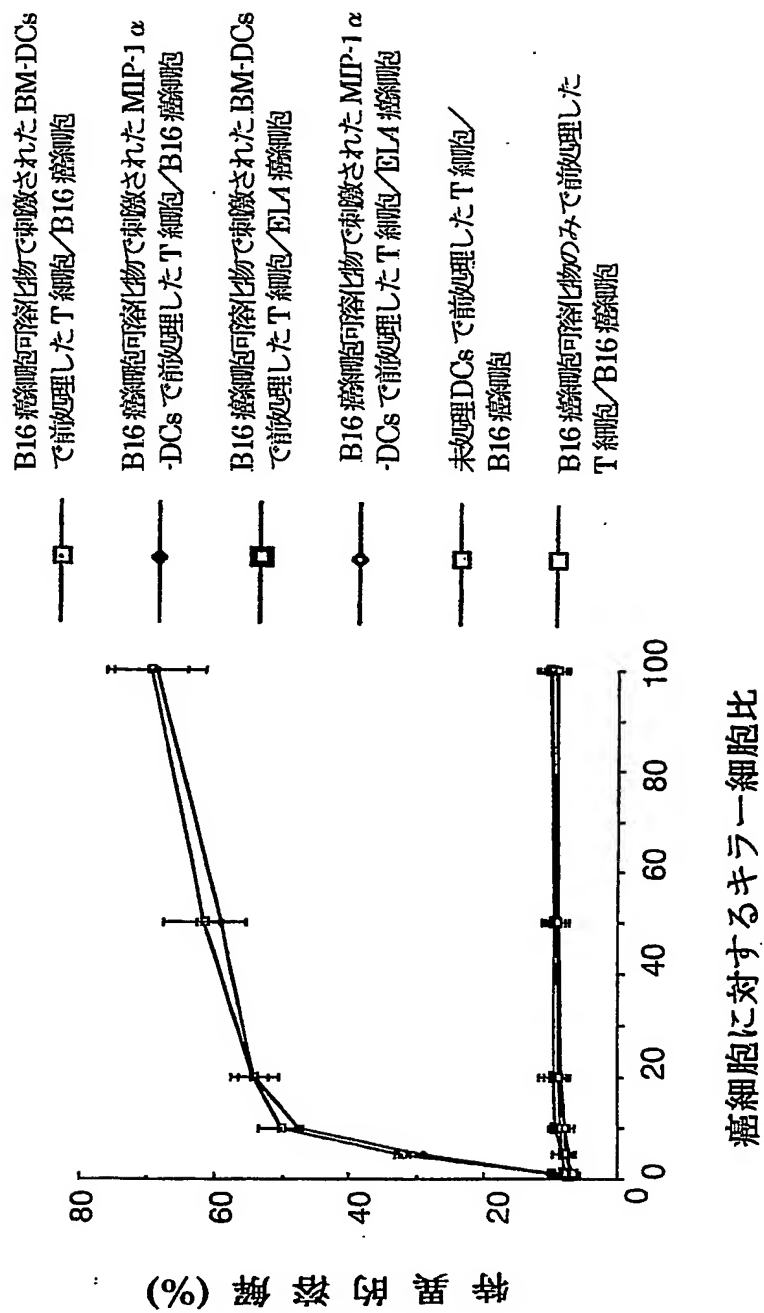


Fig.6

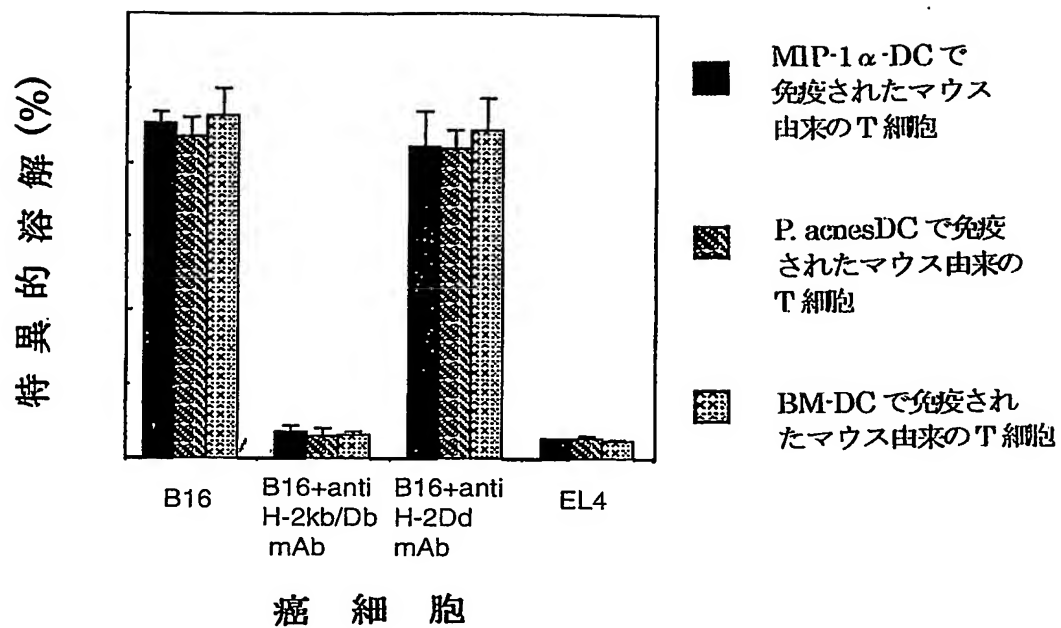


Fig.7

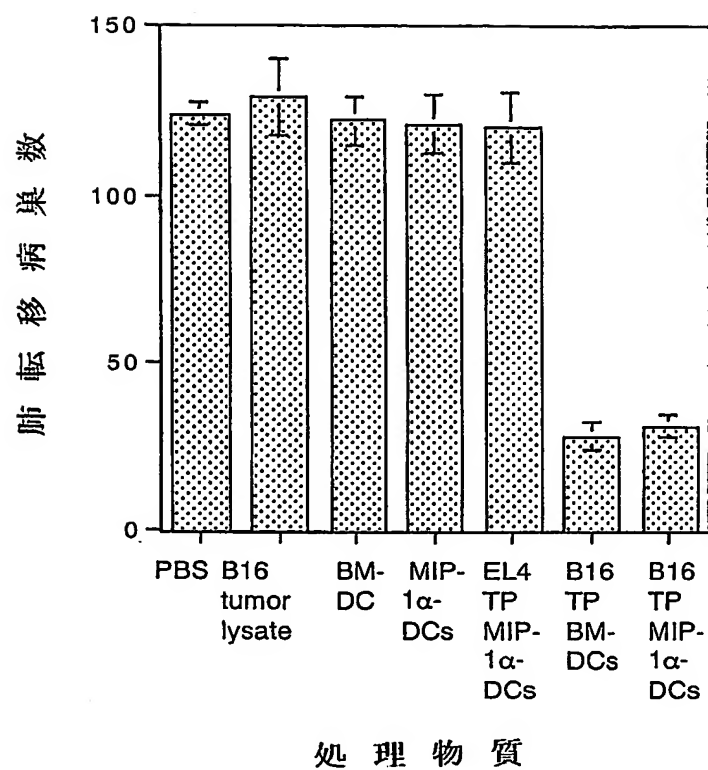
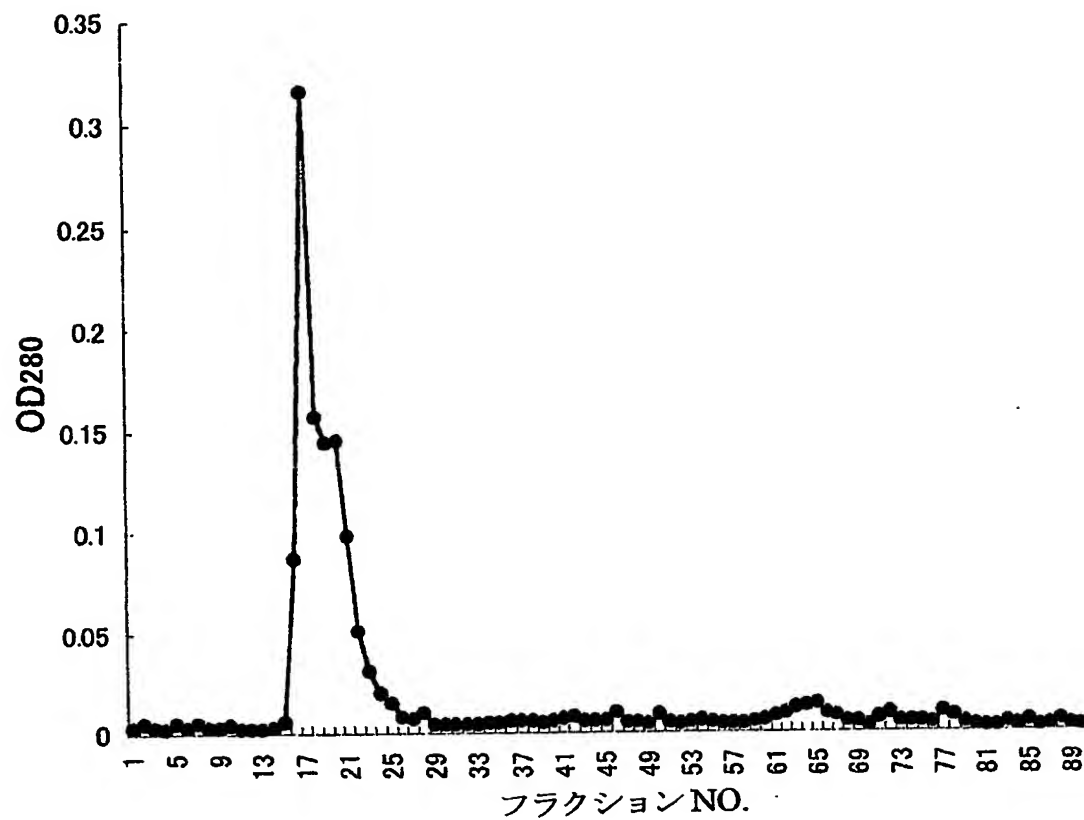


Fig.8



BB10010 SMA-BB10010

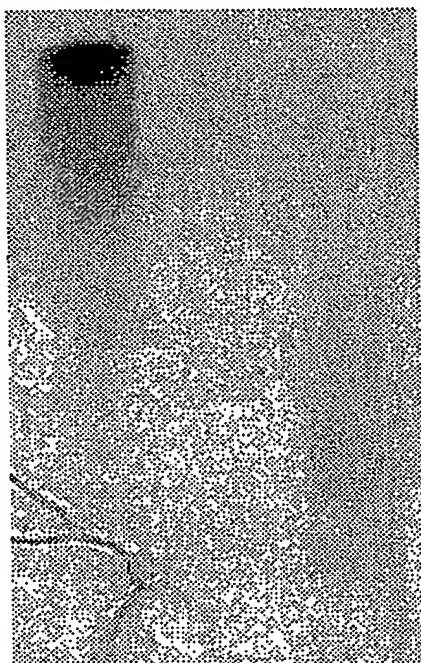
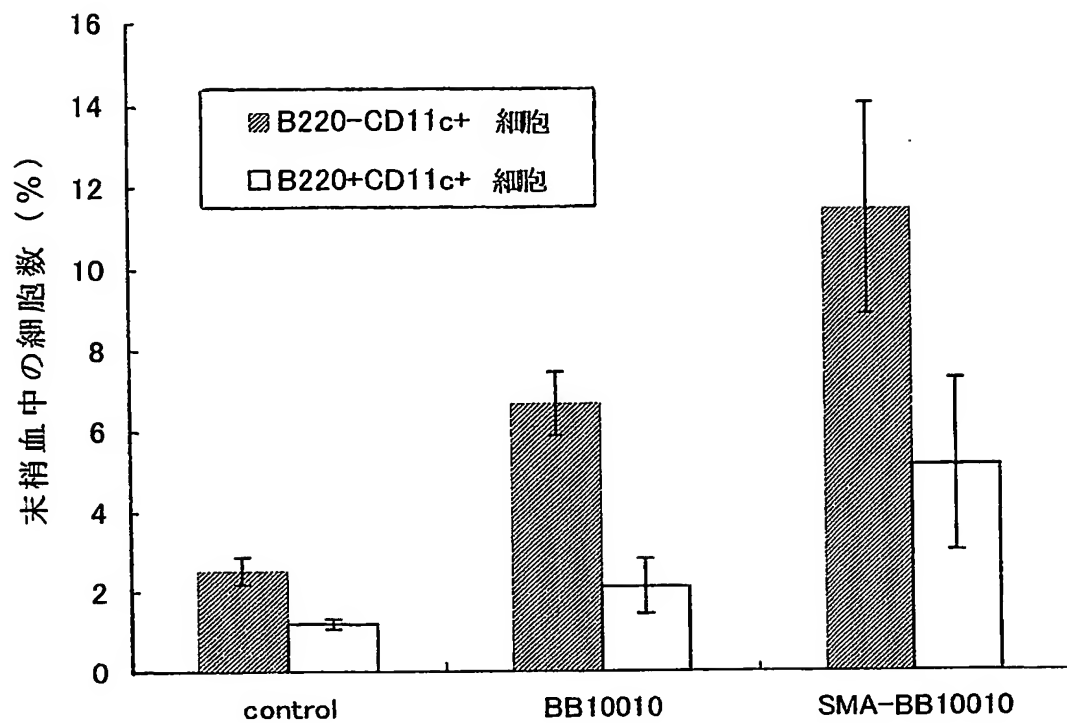


Fig.9



Fig.10



## SEQUENCE LISTING

<110> Effector Cell Institute  
MATSUSHIMA, Kouji

<120> Increasing of Dendritic Cell precursors in peripheral blood

<130> NTK03-1564WO

<140>  
<141>

<150> JP 2002-310090  
<151> 2002-10-24

<150> JP 2003-170091  
<151> 2003-06-13

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 1  
ccagcgaagc cggcaggtct gtgctgacct ag 32

<210> 2  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 2  
ctgggggtcag cacagacctg ccggcttcgc ttgg. 34

<210> 3  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Homo sapiens sequence bound to Brevibacillus choshinensis sequenc  
e

<400> 3  
catgccatgg ctttcgcttc acttgctgct gacac 35

<210> 4  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 4  
cgcggatcct caggcactca gctctag 27

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13416

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/17, A61P35/00, 37/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/17, A61P35/00, 37/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	DIEU, Marie-Caroline et al., Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different enatomic sites, J.Exp.Med., 1998, Vol.188, No.2, pages 373 to 386, full text; particularly, page 373, abstract	1-5 6-19
X Y	LIN, Chen-Lung et al., Macrophage-tropic HIV induces and exploits dendric cell chemotaxis, J. Exp.Med., 2000, Vol.192, No.4, pages 587 to 593, full text; particularly, page 587, abstract	1-5 6-19
Y	WO 01/83548 A1 (Effector Cell Institute), 08 November, 2001 (08.11.01), Full text; particularly, Claims 1 to 15; page 4, line 18 (Family: none)	7-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 14 January, 2004 (14.01.04)	Date of mailing of the international search report 27 January, 2004 (27.01.04)
------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13416

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HUNTER, M.G. et al., BB-10010:an active variant of human macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ with improved pharmaceutical properties, Blood, 1995, Vol.86, No.12, pages 4400 to 4408, full text; particularly, page 4400, abstract	1-19

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/17, A61P35/00, 37/04

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/17, A61P35/00, 37/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)	BIOSIS (STN)
REGISTRY (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)	

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	DIEU, Marie-Caroline <i>et al</i> , Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites, J. Exp. Med., 1998, Vol. 188, No. 2, pp373-386, 全文, 特に第373頁Abstract	1-5 6-19
X Y	LIN, Chen-Lung <i>et al</i> , Macrophage-tropic HIV induces and exploits dendritic cell chemotaxis, J. Exp. Med., 2000, Vol. 192, No. 4, pp587-593, 全文, 特に第587頁Abstract	1-5 6-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの。  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 01. 2004

国際調査報告の発送日

27. 1. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

4C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 01/83548 A1 (エフエクター細胞研究所) 2001. 11. 08, 全文, 特に 請求項1-15, 第4頁第18行 (ファミリーなし)	7-19
Y	HUNTER, M.G. <i>et al</i> , BB-10010: an active variant of human macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ with improved pharma- ceutical properties, Blood, 1995, Vol. 86, No. 12, pp4400-440 8, 全文, 特に第4400頁Abstract	1-19